



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS DE LARANJEIRAS DO SUL
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

DANIELI NATALI KONOPKA

**AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DE RESÍDUOS DE CASCA DE MANDIOCA
FERMENTADOS POR *YARROWIA LIPOLYTICA***

**LARANJEIRAS DO SUL
2018**

DANIELI NATALI KONOPKA

**AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DE RESÍDUOS DE CASCA DE MANDIOCA
FERMENTADOS POR *YARROWIA LIPOLYTICA***

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção de grau
de Bacharel em Engenharia de Alimentos da
Universidade Federal da Fronteira Sul

Orientador: Prof. Dr Thiago Bergler Bitencourt

**LARANJEIRAS DO SUL
2018**

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Konopka, Danieli Natali

Avaliação Nutricional de resíduos de casca de
mandioca fermentados por *Yarrowia Lipolytica* / Danieli
Natali Konopka. -- 2018.
50 f.:il.

Orientador: Doutor Thiago Bergler Bitencourt.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Engenharia de Alimentos, Laranjeiras do Sul, PR , 2018.

1. Microbiologia aplicada. 2. Biocatálise. 3. Química
orgânica. 4. Análise de alimentos. I. Bitencourt, Thiago
Bergler, orient. II. Universidade Federal da Fronteira
Sul. III. Título.

DANIELI NATALI KONOPKA

**AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DE RESÍDUOS DE CASCA DE MANDIOCA
FERMENTADOS POR *Yarrowia lipolytica***

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Alimentos na Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Laranjeiras do Sul-PR.

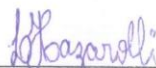
Orientador: Professor Dr. Thiago Bergler Bitencourt

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 07 / 12 / 2018

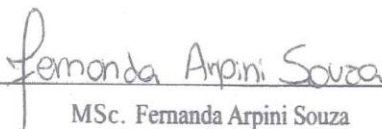
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Thiago Bergler Bitencourt



Profª. Drª. Luísa Helena Cazarolli



MSc. Fernanda Arpini Souza

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por me guiar e me amparar em todos os momentos da minha vida, dando-me força, saúde e coragem para continuar seguindo em busca dos meus sonhos. A minha família, Mãe Cleunice, irmãs Francieli e Fabieli por sempre me apoiarem em todos os momentos, e compreenderam meus momentos de ausência. Ao meu namorado Alexandre, que sempre me incentivou, entendeu e aconselhou em todos os momentos e que, apesar da distância sempre se fez presente. As minhas amigas Márcia, Vanessa, Luciellen e Mariani pela amizade e apoio ao longo do curso.

Meu agradecimento especial ao meu professor orientador e amigo Thiago Bergler Bitencourt por nunca me deixar desistir mesmo nos momentos mais difíceis, grata pela confiança, amizade, incentivo, orientação e oportunidade de aprendizado.

A professora Patrícia Valente - Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – UFRGS que gentilmente cedeu cepas da levedura utilizada no trabalho.

Aos produtores da cidade de Laranjeiras do Sul-PR que gentilmente cederam as cascas de mandioca.

Agradecimento em especial a banca examinadora, Professora Doutora Luísa Helena Cazarolli, e MSc. Fernanda Arpini Souza, pela disponibilidade e por toda ajuda na avaliação do trabalho.

A toda equipe dos laboratórios da UFFS – Laranjeiras do Sul que sempre estiveram dispostos a auxiliar e incentivar, principalmente a Fernanda Arpini Souza que sempre me auxiliou em todos os momentos de dificuldade.

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho.

RESUMO

O Brasil possui um grande potencial para a produção agrícola, e sua elevada geração de resíduos ou subprodutos agroindustriais, bem como a crescente demanda e pesquisa na área microbiana, que tem levado a utilização de leveduras como a *Yarrowia lipolytica* em processos de bioconversão para produção de diversos produtos de interesse industrial. A fermentação Submersa se apresenta como uma tecnologia capaz de propor caminhos alternativos para os resíduos gerados, diminuindo possíveis problemas ambientais de modo a agregar valor a essas matérias-primas que anteriormente eram considerados subprodutos ou rejeitos da indústria. O meio mineral utilizado é composto de 1% uréia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), 0,1% de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e 0,05% de sulfato de magnésio. Fazendo uso de frascos erlenmeyer com capacidade de 250 mL, contendo 5% de resíduo como fonte de carbono (casca de mandioca) e 100 mL do meio de suplementação. Dividiu-se as formulações em 4 concentrações de glicose sendo elas 0%, 4%, 8% e 12%, os frascos contendo o resíduo e o meio mineral foram autoclavados, adicionados de 2 mL da suspensão de células contendo 2×10^6 UFC/mL equivalente a concentração de 0,115 em absorbância 500nm e incubados em agitação de aproximadamente 80 rpm, o processo de fermentação realizado incubadora Shaker de bancada modelo (S-222) em intervalo de tempo pré-determinado em 9 dias a 35 °C. O uso da casca de mandioca como fonte de carbono para fermentação com *Yarrowia lipolytica* no bioprocessos para produção de lipídios e proteínas tem se mostrado vantajoso, visto que eleva de 1,66% de lipídios presente na casca *in natura* para 29,73% na biomassa de QU123, 20,36% na QU31 ambas sem adição de glicose e 3,32% para QU69 em uma concentração de 8% de glicose, enquanto que para a proteína apresentou variação de 4,69% na casca, para 45,37% QU69, 40,55% para QU123 e 74,16% QU31 ambas sem adição de glicose, visto que para a proteína quanto maior a concentração de glicose menor será a produção de proteína, aumentando desta forma a biodisponibilidade destes compostos no meio, tornando-os uma ótima fonte para utilização como suplementação de ração animal.

Palavras chaves: Leveduras, resíduos, bioprocessos

ABSTRACT

Brazil has a great potential for agricultural production, and the high generation of agroindustrial residues or byproducts, as well as the growing demand and research in the microbial area, which has led to the use of yeasts such as *Yarrowia lipolytica* in bioconversion processes for the production of products of industrial interest. Submersed fermentation has presents as a technology capable of proposing alternative paths to the waste generated, reducing possible environmental problems in order to add value to these raw materials that were previously considered by-products or waste from the industry. The mineral medium used is composed of 1% urea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), 0.1% monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4) and 0.05% magnesium sulfate. 250 mL Erlenmeyer flasks containing 5% residue as a carbon source (cassava peels) and 100 mL of the supplementation medium were used. The formulations were further divided into 4 glucose concentrations being 0%, 4%, 8% and 12%, the flasks containing the residue and the mineral medium were autoclaved, added with 2 mL of the cell suspension containing 2×10^6 CFU / mL equivalent to a concentration of 0.115 in absorbance 500nm and incubated with shaking at approximately 80 rpm, the fermentation process performed model bench shaker incubator (S-222) in a predetermined time interval in 9 days at 35 ° C. The use of cassava peel as a carbon source for *Yarrowia lipolytica* fermentation in the bioprocess for the production of lipids and proteins has been shown to be advantageous since it increases from 1.66% lipids present in the in raw material to 29.73% in the biomass of QU123, 20.36% in QU31 both without addition of glucose and 3.32% for QU69 in a concentration of 8% of glucose, whereas for the protein presented variation of 4.69% in the bark, to 45.37% QU69, 40.55% for QU123 and 74.16% QU31 both without addition of glucose, since for the protein the higher the glucose concentration the lower the protein production, thus increasing the bioavailability of these compounds in the medium, a good source for use as animal feed supplementation.

Key-words: yeasts, agroindustrial waste, bioprocess.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação da capacidade de assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrato para *Y. lipolytica*. Adaptado de Kurtzman; Fell e Boekhout (2011). 18

Tabela 2: Composição centesimal médias da raiz de mandioca encontrada em literatura. 24

Tabela 3: Teor lipídico (%) pelas diferentes linhagens de *Yarrowia lipolytica* em 9 dias de fermentação em função da concentração inicial de glicose no meio. 31

Tabela 4: Teor Protéico (%) pelas diferentes linhagens de *Yarrowia lipolytica* em 9 dias de fermentação em função da concentração inicial de glicose no meio. 35

Tabela 5: Teor de umidade (%) para as biomassas liofilizadas. 38

Tabela 6: Teor de Cinzas (%) para as biomassas liofilizadas. 40

Tabela 7: Consumo de glicose (%) pelas diferentes linhagens de *Yarrowia lipolytica* em 9 dias de fermentação em função da concentração inicial de glicose no meio. 42

Tabela 8: Carboidratos Totais (%) para as biomassas liofilizadas obtidas em diferentes concentrações de glicose. 44

LISTA DE FIGURAS




Gráfico 1: Teor lipídico (%) obtidos das biomassas fermentadas pelas linhagens QU123,  QU69,  QU31,  obtidos em função da concentração de glicose no meio. 32







Gráfico 2: Teor protéico (%) obtido das biomassas fermentadas pelas diferentes linhagens  QU69,  QU123,  QU31, obtidos em função da concentração de glicose no meio. 36

Gráfico 3: Curva analítica obtida pela correlação da absorbância em 575 nm em função da concentração de glicose obtidos pelo métodos DNS. 41

Gráfico 4 : Consumo de glicose observado utilizando as linhagens  QU123 QU69,  QU31,  obtidos em função da concentração de glicose no meio. 42

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Objetivos.....	13
1.1.1 Objetivo geral.....	13
1.1.2 Objetivo específico.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 <i>Yarrowia lipolytica</i>	14
2.2. Metabolismo do carbono em leveduras	16
2.3. Captação de açúcares e primeiras etapas do metabolismo	17
2.4. Potencial biotecnológico de leveduras.....	18
2.5. Produção de proteínas por leveduras	19
2.6. Utilização da Biomassa Protéica	20
2.7. Produção de lipases	21
2.8. Meios para o cultivo de <i>Y. lipolytica</i>	22
2.8.1. Meios de cultura complexos	22
2.9. Fermentação Submersa (FS)	23
2.10. Resíduos agroindustriais	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Materiais e equipamentos utilizados	25
3.2. Preparo do inóculo e fermentação	25
3.3 Métodos analíticos.....	26
3.3.1 Determinação de lipídios (Bligh-Dyer)	26
3.3.2 Determinação de proteínas totais (Kjeldahl)	27
3.3.3 Umidade.....	28
3.3.4. Cinzas	28
3.3.5 Determinação de Açúcares Redutores pelo método DNS	29
3.3.6 Determinação de Carboidratos Totais	30
3.3.7. Análises estatísticas	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Avaliações dos teores de lipídios da mandioca e das diferentes linhagens	31
4.2. Avaliação dos teores de proteína das biomassas obtidas em diferentes linhagens.	35
4.3. Avaliação do teor de Umidade	38
4.4. Avaliação do teor de Cinzas.....	40
4.5. Avaliação de açúcares redutores	41
4.6. Avaliação dos carboidratos totais.....	44
5.0. CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
6.0. REFERÊNCIAS	46

1.INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos principais produtores de alimentos do mundo segundo a Organização das Nações Unidas para a alimentação e Agricultura (FAO), porém ainda enfrenta a realidade do desperdício, em todas as etapas, desde a cadeia produtiva ao consumidor final, as perdas ocorrem desde a colheita, em cerca de 10% da produção, e ainda se estima em média que 10% do desperdício ocorre na casa dos consumidores, e o restante se perde ao longo da cadeia produtiva totalizando uma perda média de 64% de toda a produção de alimentos, fato em que, por consequência, aumenta o preço final refletindo na quantidade e na qualidade dos produtos.

Atualmente há um forte consenso quanto à minimização e recuperação de restos residuais, ao contrário do que era realizado no passado, quando resíduos eram dispostos em aterros sanitários ou empregados sem tratamento para ração animal ou adubo. O aproveitamento de subprodutos e bioconversão de tais resíduos são cada vez mais difundidos e necessários para as cadeias agroindustriais (EMBRAPA, 2005).

Considerando o grande potencial do Brasil para a produção agrícola, e sua elevada geração de resíduos ou subprodutos agroindustriais, sugere-se como fonte de redução de potenciais poluentes, o uso da fermentação submersa de resíduos, tais como, a casca de mandioca, que se apresenta como uma tecnologia capaz de propor caminhos alternativos para os resíduos gerados, diminuindo possíveis problemas ambientais, bem como, agregando valor a essas matérias-primas (EMBRAPA, 2005).

As leveduras são um grupo de microrganismos eucarióticos capazes de reproduzir-se de forma rápida e vegetativa, em ambientes líquidos, sendo que alguns indivíduos destes grupos ainda são capazes de sintetizar lípases, dentre eles as do gênero *Yarrowia*.

Seu uso está associado a processos industriais que incluem a produção de uma variedade de compostos bioquímicos como, por exemplo, etanol (GONÇALVES, 2007).

Yarrowia lipolytica é classificado como fungo estritamente aeróbico e oleaginoso, não patogênico e pertencente à classe dos ascomicetos, ou seja, são fungos unicelulares que conseguem se adaptar a substratos hidrofóbicos, encontrado em três diferentes formas morfogênicas: levedura, pseudo-hifa e hifa.

O que o difere dos demais fungos é sua capacidade de secretar grandes quantidades de ácidos orgânicos, tais como, ácido cítrico e pirúvico, além de secretar enzimas como lipases e proteases (OLIVEIRA, 2014).

Os resíduos agroindustriais apresentam um grande potencial como matéria-prima para produção de biossurfactante, uma vez que são ricos em nutrientes e são de baixo custo. O desenvolvimento e implementação de processos sustentáveis capazes de converter biomassa em vários produtos com valor agregado é uma necessidade absoluta para aproveitar resíduos agroindustriais e gerar menor impacto ambiental (ROSA, et al., 2011).

A determinação dos parâmetros fisiológicos básicos, relativos ao crescimento das linhagem de *Yarrowia lipolytica* QU31 e QU123 e QU69, sob diferentes concentrações de glicose e usando como fonte de carbono casca de mandioca (0, 4%, 8% e 12%), poderá servir também como base para futura utilização desta levedura em processos biotecnológicos industriais.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Promover a valorização nutricional do resíduo da casca de mandioca mediante a fermentação por *Yarrowia lipolytica*, proveniente de diferentes linhagens sob diferentes condições reacionais.

1.1.2 Objetivo específico

- ✓ Verificar o uso de casca de mandioca como fonte de carbono para a fermentação.
- ✓ Avaliar o potencial das diferentes linhagens de *Yarrowia lipolytica*
- ✓ Avaliar o potencial de produção de proteína em meio de cultivo contendo como fonte de carbono a casca de mandioca
- ✓ Estudar a influência de diferentes concentrações de glicose em proporções extremas na capacidade de produção de proteínas da levedura em meio de cultivo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Yarrowia lipolytica*

Segundo Barth e Gaillardin (1996), estudos relacionados com a levedura *Yarrowia lipolytica* tiveram início em meados de 1940 devido a suas características fisiológicas distintas das demais leveduras. As primeiras linhagens desta espécie eram mais comumente identificadas em substratos ricos em lipídios e proteínas (queijos, embutidos, iogurtes etc.). E de fato, essa espécie, na época classificada como *Candida lipolytica*, utiliza também açúcares como fonte de carbono, pois imediatamente assimilava diferentes tipos de álcoois, ácidos orgânicos e n-alcanos.

Pesquisas mostram que a *Y. lipolytica* possui um habitat primário na natureza, essa espécie pode ser encontrada em ambientes marinhos especificamente em locais hipersalinos, além de ser comumente encontrada em alimentos ricos em fontes proteicas, tais como queijos e produtos lácteos (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Com o avanço da tecnologia, em meados de 1990, iniciou-se o desenvolvimento de ferramentas genéticas e a percepção de que essa levedura é capaz de expressar e secretar proteínas, como a protease extracelular alcalina (AEP), dando início à análise da secreção de proteínas nos laboratórios de Gaillardin (França), Ogrydziak (EUA). Estados Unidos posteriormente pelo grupo Dominguez (Espanha). Estes grupos propuseram que *Y. lipolytica* poderia ser um hospedeiro alternativo para produção de proteína heteróloga (Possui uma grande aplicabilidade quer a nível biotecnológico quer medicinal). Em meados da década de 1990, devido à sua capacidade de crescer em ácido oléico, o grupo de Rachubinsky (Canadá) utilizou *Y. lipolytica* para a análise dos genes envolvidos na biogênese do peroxissomo, junto com o grupo Nicaud (França) e mais tarde pelos grupos de Barth e Sibirny e (Alemanha e Ucrânia, respectivamente) para a análise da pexofagia. Nicaud (França) e Mauersberger (Alemanha) realizaram análises genéticas da via de degradação HS enquanto Belin e Nicaud (França) desenvolveram geneticamente a *Y. lipolytica* para melhorar a produção de lactona (FICKERS, et al., 2005).

Destacam-se ainda algumas propriedades que caracterizam esta levedura, tais como, degradação muito eficiente em substratos hidrofóbicos, entre eles n-alcanos, ácidos graxos, gorduras e óleos para os quais possui vias metabólicas específicas. Trata-

se de um organismo intracelular que pode acumular óleo, secreção de grandes quantidades de ácidos orgânicos, alta capacidade de secreção enzimática e de grande aceitação, além do fato de ser considerada uma levedura segura, (GRAS). Todos estes fatores reforçam o interesse por essa levedura como um potencial produtor de produtos básicos, tais como, lipases e ácidos orgânicos (BARTH e GAILLARDIN, 1997).

Yarrowia lipolytica é uma levedura capaz de assimilar hidrocarbonetos, ácidos graxos livres e outros lipídeos complexos para serem usados como fonte de carbono e energia. Possui amplo potencial para ser empregada em processos de tratamento de efluentes ricos em lipídios e na produção de ácidos orgânicos, tais como, ácido cítrico, α -cetoglutárico e pirúvico (OLIVEIRA, 2014). Ainda segundo Finogenova *et al.*, (2002) a *Yarrowia lipolytica* é capaz de produzir lipase, enzima que apresenta grande interesse para o uso em indústria de couro ou de queijos (German Patent DD-272867), pois trata-se de uma levedura capaz de produzir e excretar no meio uma ampla variedade de ácidos orgânicos incluindo o citrato.

Yarrowia lipolytica não é considerada patogênica, diferentemente de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Há poucos relatos de linhagens capazes de desenvolver-se em temperaturas superiores a 32 – 34 °C, estudos mostram que todas as linhagens de *Y. lipolytica*, isoladas de ambientes marinhos no Rio de Janeiro, apresentaram crescimentos adequados a temperatura de no máximo 35 °C.

Yarrowia lipolytica tem como nicho, substratos ricos em lipídios e proteínas, mas a grande maioria das cepas são isoladas do solo, de rede de tratamento de esgoto e de ambientes contaminados com óleos. Apresenta vigoroso crescimento em diferentes valores de pH e apesar de ter um crescimento ótimo a 30 °C, também é capaz de crescer em uma ampla faixa de temperatura entre 5 e 32 °C (BARTH; GAILLARDIN, 1997).

Alguns estudos mostram a influência do ácido acético e de outros ácidos carboxílicos fracos no crescimento e na morte celular de *Yarrowia lipolytica*. Estes autores observaram que a levedura apresenta crescimento diáuxico (Quando um organismo cultivado em uma mistura de duas fontes de carbono e energia utiliza preferencialmente uma delas para crescer.) (RODRIGUEZ e PAIS, 2000).

2.2. Metabolismo do carbono em leveduras

Açúcares são utilizados por todas as leveduras conhecidas, possuindo como característica central a conversão de glicose-6-fosfato (G6P) e frutose-6-fosfato (F6P) em piruvato através do maquinário enzimático que compõem a via glicolítica (OLIVEIRA, 2014).

O destino do piruvato, a partir de então, depende da espécie de levedura ou mesmo da condição de cultivo. Em condições aeróbicas, o piruvato é oxidado completamente a CO₂ via Ciclo do Ácido Cítrico (ciclo tricarboxílico ou ciclo de Krebs). No entanto, algumas leveduras consideradas Crabtree positivas (capacidade de realizar fermentação alcoólica em condições aeróbicas), possuem sua capacidade respiratória bloqueada quando submetidas a altas concentrações de determinados açúcares (glicose, sacarose, maltose etc.) mesmo em condições de plena aerobiose. A exemplo observa-se a *S. cerevisiae*, que fermenta açúcares, preferencialmente, mesmo em condições de plena aerobiose (OLIVEIRA, 2014).

Portanto, para o restante das leveduras, o metabolismo energético e de carbono possuem como caminho central a via glicolítica e o Ciclo do Ácido Cítrico (CAC), que desempenham papel fundamental na produção de energia (ATP), na redução das coenzimas NADH e NADPH (a partir de suas formas oxidadas) e na formação dos blocos primários à síntese de outras biomoléculas indispensáveis ao metabolismo (FLORES *et al.*, 2000).

O mecanismo de utilização de açúcares por leveduras tem sido bastante estudado em *Saccharomyces cerevisiae*, sendo que existem diversas variações entre as espécies de leveduras, um exemplo é que na maioria das leveduras não convencionais, como *Yarrowia lipolytica* o processo ocorre ao contrário da *S. cerevisiae*, onde a respiração ocorre na presença de oxigênio, sendo este essencial para o uso de açúcares (FLORES *et al.*, 2000).

Apesar da produção de biossurfactantes (compostos constituídos por subprodutos dos sistemas metabólicos microbianos) ocorrerem na presença de fontes de carbonos solúveis em água, como os açúcares, estudos mostram que as maiores produções de biossurfactantes são obtidas quando substratos hidrofóbicos são adicionados. Muitos trabalhos descrevem a importância da combinação entre um substrato insolúvel em água e carboidratos, como constituintes do meio de cultura (HOMMEL *et al.*, 1994).

2.3. Captação de açúcares e primeiras etapas do metabolismo

A necessidade de transporte da fonte carbono para o meio intracelular é comum a todas as leveduras, uma vez que a membrana celular não é permeável a uma vasta gama de solutos, dentre eles os açúcares. Para tal, a captação é intermediada por transportadores específicos, comumente denominados permeases, cujos genes responsáveis por sua transcrição são regulados em função da presença e concentração de diferentes fontes de carbono no meio de cultivo. A primeira etapa no metabolismo corresponde ao transporte da fonte de carbono pelo microrganismo, exceto nos casos de di- ou tri-sacarídeos que são hidrolisados externamente. Por exemplo, a sacarose, na maioria dos casos, é hidrolisada externamente por uma invertase, cuja expressão é inibida pela presença de glicose. A literatura reporta a espécie *Yarrowia lipolytica* como sendo incapaz de assimilar sacarose (como visto na tabela 1), justamente por não ser capaz de secretar nenhuma invertase para hidrólise prévia deste dissacarídeo (OLIVEIRA, 2014).

Y. lipolytica possui um sistema de transporte de glicose com apenas dois componentes: um de alta afinidade (após crescimento em 0,05% de glicose) e um de baixa afinidade (após crescimento em 2% de glicose), cujos valores de K_m são 0,14 e 1,3 mM, respectivamente.

Após a glicose ser transportada para dentro da célula, a etapa que se segue é fosforilação intracelular intermediada por hexoquinases. A fosforilação da glicose pela célula evita que a mesma difunda-se para o meio extracelular (DOES; BISSON, 1989).

Tem-se conhecimento da existência de isoformas específicas de hexoquinases (i.e. isoenzimas) que possuem atuação seletiva de acordo com o substrato que preferencialmente reconhecem. Por exemplo, enquanto hexoquinases genéricas não possuem especificidade de substrato (i.e. atuam tanto na fosforilação de glucose, frutose e manose), glicoquinases atuam especificamente na fosforilação de glicose. Nos mamíferos, desempenham papel na regulação metabólica dos níveis de glicose nos tecidos onde são mais abundantes (i.e. fígado, pâncreas, trato intestinal e cérebro) (OLIVEIRA, 2014).

A Tabela (1) a seguir apresenta a assimilação de algumas fontes de carbono pela *Y. lipolytica* mostrando que ela é capaz de assimilar glicose.

Tabela 1: Avaliação da capacidade de assimilação de diferentes fontes de carbono pela *Y. lipolytica*. Adaptado de Kurtzman; Fell e Boekhout (2011).

Glicose	+	D-Ribose	v
Inulina	-	Metanol	-
Sacarose	-	Etanol	+
Rafinose	-	Glicerol	+
Melibiose	-	Eritritol	+
Galactose	v	Ribitol	V
Lactose	-	Galactiol	-

Legenda: (+) apresenta crescimento; (-) não apresenta crescimento e (v) variável.

Fonte: AZAMBUJA,(2016) Adaptado de Kurtzman; Fell e Boekhout (2011).

2.4. Potencial biotecnológico de leveduras

Ao longo do tempo tem se observado o crescimento do uso de leveduras em “aplicações biotecnológicas”. Como exemplos desta aplicação destacam-se desde os mais primitivos processos fermentativos para produção de bebidas alcoólicas e crescimento de pães, até os processos atuais de produção de biofármacos. Por esse motivo, as leveduras podem ser relacionadas entre os organismos mais utilizados pelo homem há mais tempo. Estima-se que desde 2000-6000 AC os sumérios já detinham o conhecimento “biotecnológico” para produção de cerveja e os egípcios para produção de pães fermentados (WALKER, 1998).

A produção de biomassa de leveduras como fonte de proteínas tem se mostrado com elevado potencial econômico, principalmente considerando-se que pode substituir as tradicionais fontes de proteína utilizadas em rações animais, que apresentam um custo mais elevado. Tal biomassa caracteriza-se por poder apresentar elevado teor protéico, sendo mencionado, por exemplo, para *Candida utilis*, até 59,8% de proteína em relação ao peso seco utilizando-se glicose como fonte de carbono, além de conter aminoácidos essenciais e vitaminas (GÉLINAS e BARRETTE, 2007).

2.5. Produção de proteínas por leveduras

Atualmente vem se buscando cada vez mais a qualidade no uso de produtos de origem microbiana para alimentação animal e humana, sendo que esta qualidade está diretamente ligada a seleção dos microrganismos, escolha do substrato, do processo, bem como as características do microrganismo. Estes fatores são determinados para saber se, as proteínas produzidas terão fins alimentares. Se a proteína for utilizada na alimentação animal, deve-se comprovar a segurança da espécie utilizada, dos substratos, dos produtos e o valor nutricional adequado. Para o consumo humano, torna-se um pouco mais criterioso, além dos itens já citados anteriormente leva-se em consideração, a ausência de mutagenicidade, teratogenicidade, alergenicidade, características organolépticas ou funcionais e aceitabilidade cultural (ROEPCKE, 2007).

Sabe-se que as leveduras foram os primeiros microrganismos utilizados na produção de proteínas e são os que mais vêm sendo estudados. Também são aqueles com maior aceitação pelos consumidores, devido ao fato de que dificilmente sejam tóxicas ou patogênicas. As leveduras são constituídas de proteínas, carboidratos, matéria graxa, sais minerais e contém ainda vitaminas, cujas proporções variam com a cepa e com o meio ambiente. A variação das condições de nutrição, da natureza do substrato, da reação do meio, ocorrência de aeração, lavagens e outros fatores, influenciam a composição do microrganismo (LIMA e SATO, 2001).

O microrganismo ideal para a produção de proteína deve possuir uma série de características tecnológicas, entre elas citam-se a alta taxa de crescimento específico e rendimento de biomassa, alta afinidade pelo substrato além de poucas necessidades nutricionais, habilidade em desenvolver alta densidade celular, além de uma composição balanceada de proteínas e lipídios e baixo teor de ácidos nucléicos, boa digestibilidade e baixa toxicidade (ROEPCKE, 2007).

Segundo Anupama e Ravindra (2000) as proteínas de organismos unicelulares são proteínas em sua maioria obtidas de cultivos microbianos, utilizando como substratos resíduos agrícolas e industriais disponíveis, nestes casos a biomassa é obtida por processo submerso ou em estado sólido. As biomassas microbianas, em geral, são particularmente ricas em vitaminas do complexo B e em proteínas contendo aminoácidos essenciais, de modo que constituem uma potencial fonte de enriquecimento e fortificação de dietas deficientes.

2.6. Utilização da Biomassa Protéica

No Brasil, cerca de 50% do mercado das leveduras é destinado principalmente para alimentação de aves, seguido pelos suínos com 25%, ruminantes e outros com 15%. Já no exterior, o grande mercado das leveduras é o sudeste asiático, destacando-se principalmente Japão, em seguida Austrália e Nova Zelândia, seguidos pela Europa, Estados Unidos e América Latina, sendo o mercado de suínos, aquicultura e animais domésticos os que apresentam uma maior demanda (GHIRALDINI e ROSSEL, 1997, citados por BELLUCO, 2008).

Desta forma se torna interessante a utilização de levedura como um suplemento nutricional para animais e humanos, principalmente com acréscimo de micronutrientes em sua composição. Atualmente vem crescendo o número de estudos para viabilizar a utilização de subprodutos agroindustriais na alimentação animal. O aumento na busca por alimentos não convencionais tem se dado devido, principalmente, às frequentes altas nos preços dos grãos de cereais e fontes protéicas vegetais. Dentro deste contexto, a proteína de origem microbiana mostra-se como uma alternativa viável à substituição dos componentes básicos que compõem as rações (MAIA et al., 2001).

Com o aumento do custo das rações para peixes e a instabilidade na suplementação em longo prazo, a busca por fontes alternativas de proteínas assume um papel importante para o futuro deste segmento, uma vez que vem crescendo a necessidade de desenvolvimento de gêneros alimentícios com proteínas de baixo custo e elevada qualidade. Portanto, o uso da biomassa protéica de origem microbiana pode ser considerado uma solução para substituir parte da proteína requerida na alimentação de peixes e tornar-se uma alternativa viável e economicamente rentável (LEE e KIM, 2001).

No setor da aquicultura os gastos com alimentação correspondem à maior parcela dos custos totais de produção nas criações semi-intensivas em função das rações para peixes possuírem elevado teor de proteína, em comparação às rações para outros animais cultivados. Tentando contornar esta situação, Furuya *et al.* (2000), verificaram que é possível a utilização de 14% de levedura desidratada em rações no cultivo de alevinos de tilápia-do-nilo.

Estudos realizados com a levedura *Candida utilis*, como fonte de proteína na dieta da tilápia, indicaram que a substituição da proteína animal por uma mistura de compostos de origem vegetal, acarreta em um melhor desempenho de crescimento nos

peixes que foram alimentados com 30% de levedura na dieta (OLVERA-NOVOA *et al.*, 2002).

Segundo Moreira *et al.* (2002), na suinocultura, os gastos com alimentação representam aproximadamente 75% dos custos totais da criação, sendo as rações basicamente constituídas por milho e farelo de soja, o uso da biomassa de leveduras, como uma fonte alternativa podem substituir do ponto de vista nutricional e econômico estes compostos. De acordo com o estudo, a levedura *Saccharomyces sp* pode ser utilizada em rações de suínos nas fases de crescimento e pré-abate em níveis de até 21%.

2.7. Produção de lipases

A habilidade dos microrganismos em sintetizar lipídios é conhecida desde o início do século XIX, os primeiros testes de utilização industrial desse potencial são datados desde a Primeira Guerra Mundial, na Alemanha, e foram repetidas durante a segunda guerra mundial, terminado em 1945. Após a guerra, a produção de matéria graxa por via microbiana continuou a merecer a atenção dos pesquisadores (LIMA e SATO, 2001).

A capacidade natural da *Y. lipolytica* em consumir substratos hidrofóbicos (SH) baseia-se em sua habilidade em secretar lipases para o meio extracelular. As lipases possuem um papel fundamental no início do processo de assimilação desse substrato, uma vez que são responsáveis por iniciar a quebra dos lipídeos (diglicerídeos e triglicerídeos) em formas mais simples assimiláveis pelo microrganismo, denominados ácidos graxos livres. Lipases são empregadas tanto na indústria alimentícia, de papel e celulose e mais recentemente foi demonstrado que lipases produzidas por *Y. lipolytica* são usadas na formulação de medicamentos para o tratamento de insuficiência exócrina pancreática (TURKI *et al.*, 2010).

Com o sequenciamento dos genes e o desenvolvimento de ferramentas de manipulação genética, *Y. lipolytica* tem se tornado um promissor modelo para o estudo da assimilação de lipídeos nos mais diversos meios, podendo ser empregada nas diversas áreas industriais (BARTH; GAILLARDIN, 1997).

2.8. Meios para o cultivo de *Y. lipolytica*

Para a criação de meios de cultura para o crescimento de leveduras deve se seguir regras similares às aplicadas ao cultivo de outros microrganismos, buscando suprir todas as necessidades nutricionais específicas a cada espécie. Diferentes espécies podem apresentar requerimentos nutricionais específicos que devem ser atendidos para que o cultivo em laboratório seja bem sucedido (OLIVEIRA, 2014).

Os meios de cultura geralmente são classificados de acordo com sua composição, sendo classificados como complexo, definido e especial ou ainda quanto a sua apresentação, sólido, semi-sólido e líquido. Geralmente utiliza-se como base de todo meio de cultura uma base líquida, e os meios semi-sólido e sólido são obtidos com a adição de diferentes concentrações de agente emulsificante, agarose (ou ágar), amido de batata, colágeno, pectina, goma xantana entre outros (GONÇALVES, 2007).

2.8.1. Meios de cultura complexos

Meios complexos de cultura são empregados para o cultivo de uma grande variedade de microrganismos. Possuem em sua composição derivados processados de animais, vegetais e fungos, tais como, caseína (proteína do leite), carne (extrato de carne), soja (caldo trípico de soja), batata, células de leveduras (extrato de levedura), gelatina, extrato de malte, sangue etc (GONÇALVES, 2007).

Um dos meios mais empregados no cultivo de leveduras é o YPD ou GYP. A sigla é proveniente do inglês, cujas iniciais denominam seus principais componentes: extrato de levedura (*Yeast extract*), peptona (*Peptone*) e dextrose (*Dextrose*). É considerado um meio de cultivo complexo, uma vez que não é possível precisar sua composição. Por conter aminoácidos essenciais, vitaminas e lipídeos, não pode ser empregado em testes de seleção de auxotróficos (Organismo que não tem capacidade para sintetizar um composto orgânico específico).

Outro meio complexo descrito para o cultivo de leveduras é o YMG. É composto basicamente por extrato de levedura (*Yeast extract*), extrato de malte (*Malte extract*), peptona e glicose (*Glucose*).

2.9. Fermentação Submersa (FS)

A fermentação submersa ocorre em meio com presença de água livre e normalmente com substratos solúveis. O crescimento é realizado em meio líquido com os nutrientes dissolvidos, embora estes possam encontrar-se em suspensão como partículas sólidas, se comparado com o método de cultivo em estado sólido, a fermentação submersa apresenta as vantagens de possuir mais fácil controle, necessita menos mão de obra para operação, melhorando assim o controle do processo, a superfície celular do substrato fica exposta ao meio, facilitando as trocas (absorção e excreção), a esterilização do meio de cultura é eficiente. A agitação em cultivos submersos tem por objetivo suprir oxigênio e colocá-lo em contato com as células em crescimento, além de facilitar as trocas metabólicas entre as células e o meio (REGULY, 2000).

2.10. Resíduos agroindustriais

Vem se expandindo o interesse por questões ambientais, visto que estas têm alavancado o interesse por fontes renováveis, neste contexto os resíduos agroindustriais tornaram-se uma fonte importante para a produção de novos materiais, de produtos químicos e de energia. Os resíduos agroindustriais apresentam um grande potencial como matéria-prima para produção de biossurfactante, uma vez que são ricos em nutrientes e são de baixo custo. O desenvolvimento e implementação de processos sustentáveis capazes de converter biomassa em vários produtos com valor agregado é uma necessidade absoluta para aproveitar resíduos agroindustriais e gerar menor impacto ambiental (ROSA, et al., 2011).

A mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) destaca-se pelo seu amplo uso na alimentação humana. As raízes são utilizadas para fabricação de farinhas, a fécula, ou amido, para produção de polvilho, a parte aérea da planta é utilizada como fonte proteica no enriquecimento de farinhas, e os resíduos gerados, como a casca de mandioca, a farinha de varredura e a massa de fecularia, como fonte alternativa na alimentação de ruminantes (ZEOULA et al., 2003).

Dez países produzem cerca de 75% das 195 milhões de toneladas de mandioca colhidas por ano em todo o mundo; o maior produtor é a Nigéria com aproximadamente 33 milhões de toneladas/ ano, seguida do Brasil com 24 toneladas/ ano; em seguida

aparecem Tailândia, Indonésia, Congo, Gana, Índia, Tanzânia, Moçambique e Angola (EMBRAPA, 2006).

A indústria da mandioca encontra-se distribuída em todo o país, sendo as regiões Norte e Nordeste as maiores produtoras, com rendimento médio de 14.872 kg.ha⁻¹ e 11.265 kg.ha⁻¹, respectivamente (IBGE, 2011).

A casca de mandioca é gerada na primeira etapa do processamento da farinha após a colheita e transporte das raízes, sendo constituída de casca, entrecasca e pontas de mandioca. Sua principal característica é o alto teor de umidade (85%) (SILVA, 2010), tornando inviável o transporte para longas distâncias. Dessa forma, o ideal é que esse resíduo seja utilizado no seu local de produção.

Sendo a casca de mandioca um resíduo com baixa quantidade de proteína e grande quantidade de fibra e energia, por isso é usado principalmente na alimentação de animais para engorda (ABRAHÃO et al., 2005).

A mandioca é composta principalmente por água e carboidratos, sendo considerada como fonte de energia devido ao alto teor de amido. A Tabela (2) apresenta a composição centesimal da mandioca.

Segundo Arpini, (2017) o resíduo da casca de mandioca é considerado um subproduto utilizado na alimentação animal, assim, o uso como fonte de carbono, pela levedura, pode agregar valor ao produto final.

Tabela 2: Composição centesimal média da raiz de mandioca encontrada em literatura.

Composição	(%) Massa Seca
Amido	82,5
Açúcares redutores	0,20
Fibras	2,70
Proteínas	2,60
Lipídios	0,30
Cinzas	2,40

Fonte: Cereda, Vilpoux e Demiate (2003)

Como observado na Tabela 2 a mandioca é uma excelente fonte de carbono apresentando um valor baixo de proteínas e lipídios. Este valor pode sofrer um acréscimo significativo se submetido a processos de bioconversão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais e equipamentos utilizados

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau P.A. e utilizados sem purificação prévia. As cepas de *Yarrowia lipolytica* QU69, QU31 e QU123 foram gentilmente cedidas pela Professora Patrícia Valente (Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – UFRGS – Brasil –RS). As cascas de mandioca foram gentilmente cedidas por produtores da cidade de Laranjeiras do Sul-PR. O espectro de absorção máxima da levedura foi determinado utilizando um espectrofotômetro de microplacas Modelo Thermo Multiskan GO. A manipulação da levedura foi realizada em capela de fluxo laminar modelo BioSeg modelo Bioseg 12 Classe II tipo A1.

3.2. Preparo do inóculo e fermentação

Para realizar o preparo do inóculo contendo as células da levedura, primeiramente foi preparado ágar GYP, conforme descrito por Csutak et. al (2015) contendo glicose 2%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5% e ágar 2%; a levedura foi isolada por esgotamento e incubada a 28 °C por 48 horas (estufa Ethik Technology, 4410-5NDRE).

Após o período de incubação, algumas colônias foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de solução salina e então realizada leitura da densidade óptica a fim de se obter absorbância de 0,115 em um comprimento de onda de 500 nm.

Foi utilizado meio de suplementação mineral descrito por Santos et al., (2013) com modificações, composto de 1% uréia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), 0,1% de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e 0,05% de sulfato de magnésio.

Foram utilizados frascos erlenmeyer com capacidade de 250 mL, contendo 5% de resíduo como fonte de carbono (casca de mandioca) e 100 mL do meio de suplementação.

Dividiu-se ainda as formulações em 4 concentrações de glicose sendo elas 0%, 4%, 8% e 12%, os frascos contendo o resíduo e o meio mineral foram auto-clavados, adicionados de 2 mL da suspensão de células contendo 2×10^6 UFC/mL equivalente a concentração de 0,115 em absorbância a 500 nm e incubados em agitação de aproximadamente 80 rpm, o processo de fermentação realizado em incubadora Shaker de bancada modelo (S-222) em intervalo de tempo pré-determinado em 9 dias á 35 °C.

3.3 Métodos analíticos

Após o processo de bioconversão a biomassa obtida foi congelada e submetida ao processo de liofilização (Liotop L101). Foram realizadas análises de proteínas e lipídios totais, Umidade, Cinzas, açúcares redutores (DNS) e Carboidratos totais tanto no resíduo *in natura* quanto na biomassa liofilizada das diferentes linhagens.

3.3.1 Determinação de lipídios (Bligh-Dyer)

A análise do teor (%) de lipídios totais foi realizada através da metodologia descrita por Bligh-Dyer (1959) com modificações. Esta metodologia pode ser utilizada em alimentos secos ou que possuam alto teor de gordura e devido ao uso de solventes apolares ocorre a extração de todas as classes de lipídios.

Para a análise foram utilizados 1,0 g de amostra que foi adicionada de clorofórmio e álcool metílico e submetida a agitação durante trinta e cinco minutos em agitador magnético, após esse período foi adicionada solução de sulfato de sódio 1,5% para que ocorresse a separação das fases. Foram coletados 15 mL da fase inferior que foi adicionada em tubo de ensaio onde foi adicionado 1 g de sulfato de sódio anidro para retirar os possíveis traços de água que poderiam estar presentes na amostra. Na última etapa foram coletados 5 mL da solução do tubo de ensaio e colocados em béquer previamente seco e tarado, o solvente presente na amostra foi evaporado em estufa com circulação de ar do modelo (TE-394/2) por 30 min e posteriormente o béquer foi pesado para se calcular o teor de lipídios da amostra através da diferença da massa do béquer. A equação utilizada para determinar a quantidade de lipídios presente na amostra está apresentada na Equação (1) a seguir.

$$L = \frac{(M_1 - M_2) * 4 * 100}{M_3} \quad (1)$$

Onde

M₁: Massa do béquer mais amostra

M₂: Massa do béquer previamente seco

M₃: Massa da amostra

L: Teor de lipídios (%)

3.3.2 Determinação de proteínas totais (Kjeldahl)

Para determinação do teor (%) de proteínas totais foi utilizada metodologia descrita por Kjeldahl, conforme procedimento AOAC (1990) com modificações. Esta análise quantifica o nitrogênio presente na amostra que é posteriormente convertido em proteínas através de um fator de conversão, neste caso, 6,25 que corresponde a alimentos em geral.

Foram utilizados 0,5 g da amostra que foi digerida com ácido sulfúrico (H_2SO_4) durante aproximadamente seis horas. Após a digestão, as amostras foram destiladas em destilador de nitrogênio (Tecnal TE-0363) e o destilado recolhido em erlenmeyer contendo 25 mL de solução de ácido bórico 4%. A última etapa da análise consistiu em titular o destilado com solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L. Para determinação de proteína total utilizou-se a Equação (2) a seguir.

$$P = \left\{ \left(\frac{(v_1 - v_0) * F * 100 * 0,0014 * 6,25}{M} \right) \right\} \quad (2)$$

Onde:

P: Porcentagem de proteína presente na amostra (%)

v_1 : Volume gasto na titulação com HCL

v_0 : Volume gasto na titulação do branco

F: Fator de correção

M: Massa da amostra

3.3.3 Umidade

A umidade das amostras foi determinada de acordo com a metodologia proposta pelas Normas Analíticas do IAL para cereais e amiláceos (1985). Para isso, as amostras foram colocadas em estufa a 105 °C durante 24h, ao final colocado num dessecador para resfriar e seguido pela pesagem. A análise foi realizada em duplicata.

Para o cálculo de umidade em porcentagem utilizou-se a Equação (3).

$$U = \frac{P * 100}{M} \quad (3)$$

Onde:

P: Perda de peso em gramas

M: Massa inicial da amostra em gramas

U: Umidade em (%)

3.3.4. Cinzas

O teor de cinzas das amostras fermentadas foi determinado segundo metodologia da AOAC, baseada na perda de peso após queima em mufla a 500 °C por cerca de 24h.

Pesa-se uma quantidade da determinada amostra em cadinho de porcelana, o qual deverá ter sido previamente incinerado, esfriado e tarado. Depois o conjunto deverá ser incinerado numa mufla, inicialmente a temperatura mais baixa e depois a 500 – 600° C. Quando a cinza estiver pronta, isto é, não restar nenhum resíduo preto de matéria orgânica, o conjunto é retirado da mufla, colocado num dessecador para resfriar e seguido pela pesagem quando atingir a temperatura ambiente. A diferença entre o peso do conjunto e o peso do cadinho vazio dá a quantidade de cinza na amostra.

Para o cálculo de cinzas em porcentagem utilizou-se a Equação (4).

$$C = \frac{P * 100}{N} \quad (4)$$

Onde:

P: Perda de peso em gramas

N: Massa inicial da amostra em gramas

C: Cinzas (%)

3.3.5 Determinação de Açúcares Redutores pelo método DNS

A reação com DNS é indicada para açúcares redutores e baseia-se na redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5nitrosalicílico resultando em um complexo de coloração acastanhada. É utilizado em solução o sal de Rochelle (tartarato de potássio e sódio tetrahidratado) para proteger o reagente da oxidação pelo oxigênio dissolvido em solução. Também deve ser adicionado o hidróxido de sódio que é o redutor da ação da glicose. O composto obtido obedece à lei de Lambert-Beer, podendo ser observada a relação entre absorvância e concentração na amostra.

Para a análise deve-se fazer as diluições da glicose para construção da curva padrão. A curva foi construída com glicose nas concentrações g. L⁻¹ que se iniciou em 5 g de glicose em 100 mL de água, sendo realizadas 5 diluições em balões volumétricos de 100mL até chegar em uma concentração de 0,156 g/mL, para a determinação dos açúcares redutores utilizou-se a metodologia descrita por Wang (2016). Para a biomassa e para casca *in natura* foi necessário obter um extrato aquoso da amostra, então, diluiu-se aproximadamente 1 g de amostra em 10 mL de água destilada. Em tubos de ensaio foram adicionados 180 µL de água destilada, 200 µL de solução de ácido dinitrosalicílico 1% (DNS) e 20µL de amostra. Em seguida os tubos de ensaio foram incubados a 100 °C por 5 minutos. Por fim, 200 µL desta solução foram transferidos para microplacas e submetidos à leitura em 575 nm em espectrofotômetro (Termo Scientific, Uniscience Multiskan GO). Os resultados foram expressos em g 100 g⁻¹ de biomassa e casca *in natura*.

Para o cálculo de açúcares foi necessário fazer a construção da curva padrão de glicose. Utilizando as concentrações pela absorvância foi possível plotar o gráfico e a partir deste montar a Equação (5).

$$Abs = 17,92 * [] \quad (5)$$

Onde:

[] : Concentração de glicose (%)

Abs: Média da absorvância das amostras

3.3.6 Determinação de Carboidratos Totais

A análise de carboidratos totais foi realizada segundo Cechi (2003), onde se calcula pela diferença entre percentual de umidade, proteínas, gordura e cinzas subtraídos de 100. Chegando a uma Equação (6) da seguinte forma.

$$\text{carboidratos Totais} = [100-(U-P-L-C)] \quad (6)$$

Onde

U: Umidade (%)

P: Proteínas (%)

L: Lipídios (%)

C: Cinzas (%)

3.3.7. Análises estatísticas

Para parâmetro de comparação entre as concentrações foi utilizado o teste de tukey com nível de significância de 95%, pelo programa (*Instat*). Para analisar se houve diferenças significativas entre as amostras utilizou-se ANOVA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação apresentada do teor de proteína, lipídios, umidade, cinzas, açúcares redutores e carboidratos totais pelas 03 (três) linhagens já citadas anteriormente e pela casca de mandioca *in natura*, podem ser observados nas tabelas a seguir.

4.1 Avaliações dos teores de lipídios da casca de mandioca e das diferentes linhagens

Neste estudo foram determinados o teor de Lipídios das biomassas produzidas por diferentes linhagens após 9 dias de fermentação, bem como da casca de mandioca *in natura*. Os resultados são mostrados na Tabela (3).

Tabela 3: Teor lipídico (%) pelas diferentes linhagens de *Yarrowia lipolytica* em 9 dias de fermentação em função da concentração inicial de glicose no meio.

Linhagens	Concentração de Glicose (%)			
	0	4	8	12
QU123	29,73 ^a ± 7,01	27,12 ^a ± 0,85	28,06 ^a ± 0,28	24,07 ^b ± 8,28
QU69	2,19 ^a ± 1,09	1,67 ^a ± 0,43	3,32 ^a ± 0,99	2,17 ^a ± 0,84
QU31	20,36 ^a ± 0,46	20,15 ^a ± 4,31	11,36 ^b ± 0,95	8,44 ^c ± 0,65

* Para casca de mandioca *in natura* obteve-se um valor de 1,66 ± 0,1.

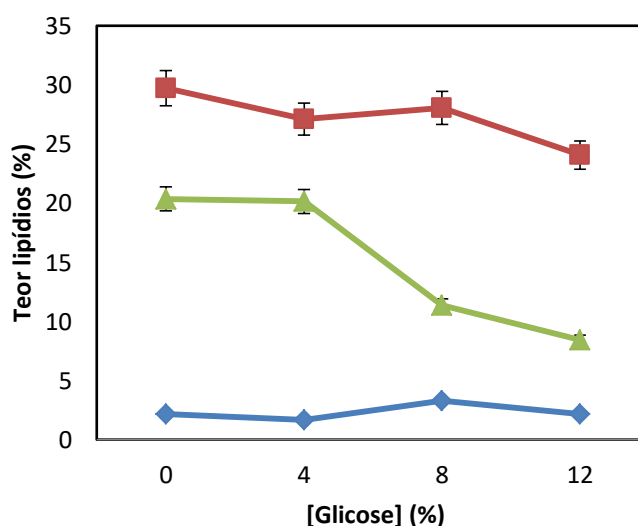
*Os resultados apresentados correspondem a média aritmética ± o intervalo de confiança (IC) a 95%.

*O intervalo de confiança foi calculado pelas linhas e as letras iguais significa que não houve diferença estatística, b e c significa que houve diferença com relação a.

Fonte: A autora

Para melhor visualização dos resultados foi plotado o Gráfico (1) da concentração de glicose por teor lipídico.

Gráfico 1: Teor lipídico (%) obtidos das biomassas fermentadas pelas linhagens QU123, QU69, QU31, obtidos em função da concentração de glicose no meio.



Fonte: A autora

Graças a sua capacidade em acumular lipídios a *Yarrowia lipolytica* é considerada uma das leveduras capazes de assimilar glicerol, dentre outros substratos (mais de 20% da sua biomassa seca é convertida em lipídios), estas leveduras, portanto, são classificadas como organismos oleaginosos (AZAMBUJA, 2016).

Quando analisadas individualmente cada linhagem podemos observar que, utilizando a QU123, observou-se uma queda na produção de lipídios com o aumento da concentração de glicose, porém, se comparada com a casca de mandioca *in natura* o ganho se deu de forma expressiva, alcançando cerca de 18 vezes o teor lipídico inicial.

Para os valores obtidos com a linhagem QU69, pode-se observar os menores valores se comparados com as demais linhagens (1,67-3,32%), porém, sem uma variação expressiva entre os valores se mantendo de forma estável com o aumento da concentração de glicose. Valores estes ainda assim superiores ao encontrados na casca.

Já para a QU31, observou-se a redução na concentração lipídica com o aumento da concentração de glicose. Houve, portanto, uma redução de aproximadamente 3 vezes o valor inicial, ocorrendo uma queda de 20,36 para 8,44%.

Ao observarmos a Tabela 3 nota-se que das três linhagens estudadas a QU123 apresentou um melhor percentual de lipídios nas biomassas mantendo uma variação bem pequena entre as concentrações de glicose, onde observou-se o melhor desempenho de 29,73% sem adição de glicose.

Em estudos realizados por outros autores não foram encontrados dados que pudessem ser comparados utilizando linhagens semelhantes testando-se diferentes composições do meio. Porém, Bento, (2017) em seu estudo sobre a composição lipídica do óleo produzido por *Yarrowia lipolytica* encontrou um teor lipídico de 36 %m/m sendo que a cepa estudada W29 encontrava-se em meio carbono rico em glicerol, mostrando que as cepas se comportam de forma diferenciada, porém alcançando valores bem próximos dos alcançados neste trabalho.

Azambuja, (2016) estudando a fisiologia e a capacidade de acúmulo de lipídios de diferentes linhagens de *Yarrowia lipolytica* e *Rhodospiridium toruloides* em meio contendo glicerol testando como diferentes fontes glicose e glicerol encontrou um melhor rendimento para a linhagem *Y. lipolytica* CCT 5443 apresentando os melhores valores de 0,054 gramas de lipídeos por grama de substrato.

Segundo Bacciotti, (2015) a produção de lipídios na *Yarrowia lipolytica* se deve ao fato desta acumular lipídios como uma forma de reserva energética. Neste estudo foi abordada a produção de partículas lipídicas por microscopia da *Y. lipolytica* w29, onde esta por sua vez chegou a produzir 0,75 partícula lipídica/célula.

Podemos observar ainda que QU31 e a QU69 apresentaram uma queda de produtividade conforme aumentava a concentração de glicose no meio, Bacciotti (2015), explica que o aumento da concentração de glicose pode inibir o desenvolvimento da levedura.

É possível ainda observar uma diferença significativa na QU31 em relação às concentrações de 4 e 8% bem como das de 8 a 12%. Já para QU69 não foi possível observar diferença significativa entre as amostras, porém esta cepa foi a que apresentou os menores valores de produção lipídica.

Em estudo realizado por Workman, Holt e Thykaer (2013), os autores relataram que a *Y. lipolytica* possui preferência pela utilização de glicerol quando cultivada em uma mistura de glicerol e glicose. Os autores explicam ainda que esta preferência é consequência do fato de no genoma da levedura, haver apenas um gene que codifica o transporte de hexoses e, pelo menos 3 genes que codificam proteínas relacionadas com o transporte de glicerol. Para este estudo, cultivaram a linhagem *Yarrowia lipolytica* IBT446 em meio de cultura totalmente definido, em glicerol ou glicose como única fonte de carbono ou uma mistura dos dois substratos, para calcular parâmetros fisiológicos. Desta forma, realizaram quatro bateladas com diferentes concentrações de fonte de carbono, sendo elas: 1) glicose 20 g/L; 2) glicerol 20 g/L; 3) glicerol 45 g/L; e

4) glicose e glicerol a 10 g/L cada. Mostrando que a mistura dos substratos produziu um melhor rendimento se comparada com as fontes puras apenas.

São escassos na literatura trabalhos que determinaram parâmetros fisiológicos da levedura *Yarrowia lipolytica* em meio de cultura totalmente definido. Quase a totalidade dos trabalhos utilizaram um ou mais suplementos complexos para impulsionar o crescimento celular, sendo o extrato de levedura o mais utilizado.

A adição destes suplementos torna o meio de cultura classificado como complexo, ou seja, não é possível determinar com exatidão a composição total do meio.

4.2. Avaliação dos teores de proteína das biomassas obtidas em diferentes linhagens.

Neste estudo foram determinados o teor de proteínas das biomassas produzidas por diferentes linhagens após 9 dias de fermentação, bem como da casca de mandioca *in natura*. Os resultados são mostrados na Tabela (4).

Tabela 4: Teor Protéico (%) pelas diferentes linhagens de *Yarrowia lipolytica* em 9 dias de fermentação em função da concentração inicial de glicose no meio.

Linhagens	Concentração de Glicose (%)*			
	0	4	8	12
QU123	40,55 ^a ±2,29	33,87 ^a ±0,46	37,912 ^a 0,66	26,95 ^b ±4,72
QU69	45,3 ^a ± 0,9	36,95 ^a ±0,85	21,58 ^a 0,52	17,66 ^a ±0,11
QU31	74,16 ^a ±14,9	52,62 ^a ±3,35	48,92 ^a ±11,04	30,24 ^b ±0,65

* Para casca de mandioca *in natura* obteve-se um valor de 4,69±0,41.

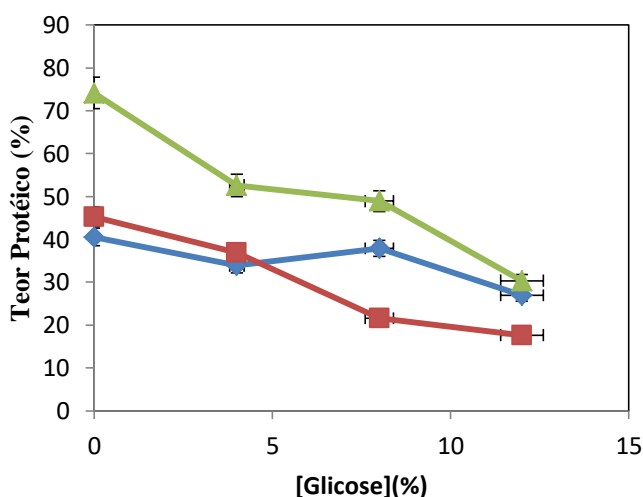
*Os resultados apresentados correspondem a média aritmética ± o intervalo de confiança (IC) a 95%.

*O intervalo de confiança foi calculado pelas linhas e as letras iguais significa que não houve diferença estatística, b e c significa que houve diferença com relação a.

Fonte: A autora

Para melhor visualização dos resultados plotou-se o Gráfico (2) que demonstra a variação do teor de proteína em diferentes concentrações de glicose.

Gráfico 2: Teor protéico (%) obtido das biomassas fermentadas pelas diferentes linhagens QU69, QU123, QU31, obtidos em função da concentração de glicose no meio.



Fonte: A autora

A produção de proteína pelas diferentes linhagens se mostrou bem eficaz se comparada a quantidade de proteína presente na casca *in natura* (cerca de 4,69%) tendo assim um incremento mínimo de 376,54% e o máximo de 1581,24%.

Quanto à produção de proteína pela linhagem QU123 podemos observar que os melhores resultados são atingidos sem adição de glicose e conforme aumenta a concentração de glicose no meio ocorre a redução expressiva da produção de proteínas, demonstrando que a linhagem não se adaptou bem ao excesso de glicose.

Quando analisada a linhagem QU69, esta também demonstrou perda expressiva no teor protéico conforme aumentou-se a concentração de glicose. Ao utilizar esta levedura observou-se também os maiores valores de proteínas sem adição de glicose.

O uso da linhagem de QU31 na fermentação de resíduos de mandioca apresentou os maiores valores de proteínas (30,24-74,16%) se comparados com as demais linhagens. Pode-se verificar, portanto, que o uso desta se comportou de forma bastante similar às demais, ocorrendo um decréscimo na produção de proteína conforme aumentava-se a concentração de glicose.

Altas concentrações de soluto dissolvido (cloreto de sódio/glicose) exercem pressão osmótica suficiente para matar ou inibir crescimento microbiano. As bactérias sintetizam e acumulam solutos compatíveis (compostos compatíveis com o metabolismo e crescimento celular mesmo em elevadas concentrações) como os

aminoácidos (ex. prolina, ácido glutâmico) com a finalidade de estabelecer o equilíbrio osmótico com o meio envolvente. Algas e fungos entre eles as leveduras acumulam sacarose e polióis (ex. arabitol, glicerol, manitol) com o mesmo fim. (NICOLAU, 2014).

Uma alternativa para o alto consumo de glicose e baixa produção de proteínas, pode estar relacionada ao desvio de substratos das rotas de síntese de aminoácidos para manter o ciclo de krebs e oxidar a acetil formado a partir do piruvato, por exemplo.

Ao compararmos o teor protéico da casca de mandioca com as biomassas obtidas, pode-se observar um ganho significativo no valor proteico, tornando a biomassa um substrato que poderá ser usado futuramente para incremento protéico em ração animal e futuras pesquisas em suplementação nutricional.

Junior (2010), em seu estudo usando a *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 cultivada em meio a base de glicerina residual e em biorreator de bancada, com agitação de 20 rpm atingindo 19,14 g/L de biomassa, chegou a valores de 13,55% de proteína e 7,87% de lipídios. Pode-se observar que os resultados obtidos foram superiores aos encontrados por este autor, portanto, vale ressaltar a diferença tanto das cepas quanto dos meios utilizados, sendo que o autor não usou nenhum resíduo como fonte de carbono e sim glicerina residual.

Vandenberghe et al. (2000) utilizaram bagaço de mandioca como fonte de carbono para bioconversão com *A. niger* para produção de ácido cítrico e observaram que houve enriquecimento proteico, sendo o teor inicial de 13,1% e ao final de 120 horas de cultivo houve incremento para 23,1%.valores estes ainda inferiores aos encontrados neste trabalho.

Joshi e Sandhu (1996) estudaram a fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* e *Torula utilis* e obtiveram aumento do valor proteico de 5,8% para 16,8%, 18,5% e 15,6%, respectivamente.

Villas-Bôas e Esposito (2000) utilizaram *Candida utilis* e bagaço de maçã como fonte de carbono para fermentação semi-sólida e alcançaram aumento de 100% no teor de proteína bruta considerado pelos autores um ganho expressivo.

4.3. Avaliação do teor de Umidade

Para análise de umidade as amostras foram submetidas a secagem em estufa convencional com circulação de ar por 24 horas em seguida realizada a pesagem das amostras e calculado a umidade pela Equação (3). Os resultados são apresentados na Tabela (5) a seguir.

Tabela 5: Teor de umidade (%) para as biomassas liofilizadas.

Linhagens	Concentrações de Glicose (%)*			
	0	4	8	12
QU31	16,27 ^a ±1,44	16,4 ^a ±0,01	19,00 ^a ±0,03	21,52 ^a ±1,87
QU123	18,82 ^a ±1,17	17,65 ^a ±2,34	17,20 ^a ±1,46	15,27 ^a ±0,27
QU69	40,70 ^a ±2,46	34,75 ^a ±0,82	26,35 ^a ±4,78	21,60 ^b ±0,84

*Casca de mandioca *in natura* obteve-se um valor de 6,47±0,07

*Os resultados apresentados correspondem à média aritmética ± o intervalo de confiança (IC) a 95%.

*O intervalo de confiança foi calculado pelas linhas e as letras iguais significa que não houve diferença estatística, b e c significa que houve diferença com relação a.

Fonte: A autora

Podemos observar que com o uso da QU31 não variou expressivamente o teor de umidade entre as diferentes concentrações. Percebe-se que com o aumento da concentração de glicose observa-se um leve ganho na umidade.

Utilizando a QU123 observou-se redução de umidade com o aumento da concentração de glicose. Já para a linhagem de QU69 esta apresentou os maiores valores de umidade, sendo de 40,70% sem adição de glicose e 21,60% com 12% de glicose no meio.

Segundo Cecchi (2003), a umidade é uma medida extremamente importante para análise dos alimentos, pois está relacionada com a estabilidade e qualidade dos mesmos. Alimentos com alto teor de umidade ao serem estocados podem deteriorar mais rapidamente que os de baixa umidade. A umidade também é comumente usada para comparar o valor nutritivo de determinados alimentos. Como podemos observar as amostras encontram-se com umidades relativamente baixas, o que pode ocasionar em uma vida de prateleira longa e estável para o produto.

Segundo Brasileiro (2013), a liofilização permite que a substância congelada tenha maior perda de água e sendo retirada por sublimação, sem passar pelo estado líquido o que permite uma umidade menor no produto final, tornando-o mais estável e aumentando sua vida de prateleira.

Nas tabelas de umidade apresentadas por Cecchi (2003) podemos encontrar valores para produtos como leite em pó (4%), farinha de peixe (15%), cereais (menor que 10%), manteigas (15%) e queijos (40-75%), porém não há dados em literatura para produtos similares ao desenvolvido neste trabalho. Entretanto ao analisarmos os valores encontrados, podemos observar que as umidades estão variando de 15 a 40% por se tratar de um produto com alto valor de lipídios e proteínas encontramos valores similares ao da manteiga e queijo. Vale ressaltar que a biomassa foi liofilizada excluindo a água livre, deixando o alimento parcialmente desidratado com aspecto de pó, o que lhe confere a umidade entre 15 á 40 %, garantindo assim sua estabilidade ao longo do tempo de armazenamento.

Menezes,Torres, Srur (2008) em seu estudo sobre valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada, encontraram valores de umidade para polpa liofilizada de 4,92%, que demonstra que em produtos liofilizados a umidade se apresenta de forma mais baixa possível visto que a mesma polpa em pó pelo método tradicional apresenta umidade de 6 á 11% .

4.4. Avaliação do teor de Cinzas

Avaliação de cinzas em um alimento é análise do resíduo inorgânico que permanece no alimento após a queima da matéria orgânica. Os teores de cinzas encontrados para as biomassas produzidas estão apresentados na Tabela (6) a seguir.

Tabela 6: Teor de Cinzas (%) para as biomassas liofilizadas

Linhagens	Concentrações de glicose (%)*			
	0	4	8	12
QU31	2,56 ^a ±1,44	0,65 ^b ±0,09	2,43 ^a ±0,03	3,74 ^a ±0,05
QU123	1,85 ^a ±0,91	2,15 ^a ±0,20	2,36 ^a ±0,05	1,35 ^a ±0,33
QU69	2,57 ^a ±0,45	4,55 ^a ±2,32	5,72 ^b ±1,15	2,19 ^a ±0,29

* Casca de mandioca *in natura* obteve-se um valor de 2,86±0,02

*Os resultados apresentados correspondem à média aritmética ± o intervalo de confiança (IC) a 95%.*O intervalo de confiança foi calculado pelas linhas e as letras iguais significa que não houve diferença estatística, b e c significa que houve diferença com relação a.

Fonte: A autora

Quando observadas as linhagens podemos visualizar que a QU69 apresentou as maiores variações de 2,19 para 12% de glicose e 5,72 para 8% enquanto que as demais apresentaram valores bem próximos variando de 1,85% para QU123 sem adição de glicose á 3,74% para QU31 com 12% de glicose.

Segundo Cecchi (2003) a cinza obtida após o processo não será necessariamente a composição mineral inicial, visto que compostos podem volatizar e ser perdidos, tais como, óxidos e sulfatos. A composição da cinza vai depender das características do alimento, o conteúdo de cinzas para alimentos como cereais varia de 0,3 à 3,3% enquanto que óleos e gorduras 2,5% para manteigas e margarinas, para produtos com alta concentração de glicose de 0 à 1,2%.

Os valores encontrados para biomassa estão bem próximos aos apresentados pelo autor para alimentos com alto teor de açúcares e ricos em lipídios, sendo que os maiores valores foram encontrados para a linhagem de QU69 aonde chegamos a valores de 5,72% para amostra com 8% de glicose.

Moretto et al (2008) diz que os teores de cinzas para alimentos devem variar de 0,1 a 15% dependendo das condições que o alimento se apresenta, o autor ainda cita que

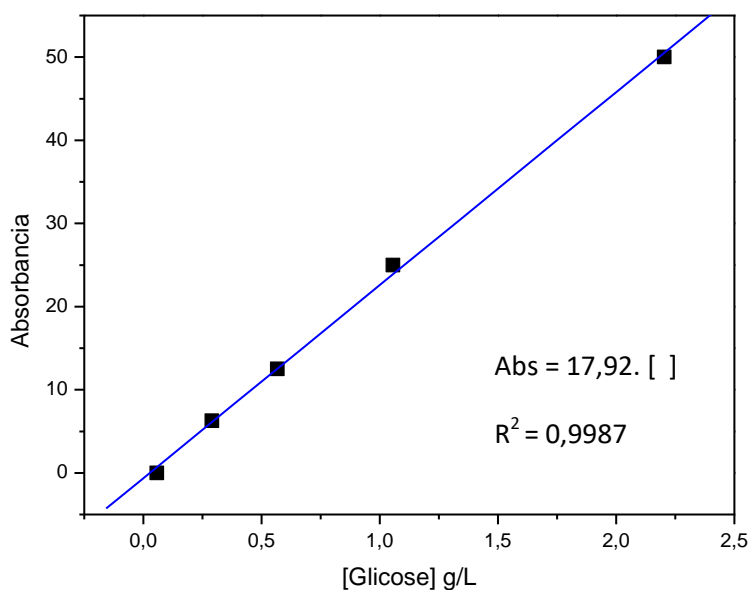
a farinha de peixe possui valor de cinzas de 15% enquanto que a farinha de trigo de 0,8%, o autor ainda ressalta que alimentos muito gordurosos ou muito açucarados apresentam dificuldade em se obter a cinzas, no caso de produtos gordurosos pode ocorrer a formação de espuma o que pode dificultar a análise, já para açucarados deve se tomar cuidado para que a amostra não respingue.

4.5. Avaliação de açúcares redutores

A análise de açúcares redutor teve por objetivo levar a levedura a condições extremas, para ver como esta se comporta em meio com altas concentrações de glicose.

O Gráfico (3) a seguir apresenta a curva utilizada para determinar a equação (3). Sendo plotado a partir da curva padrão de glicose e da leitura de absorbância da mesma em 575 nm. Com a equação já montada foi possível calcular o consumo de glicose de cada cepa. Os resultados para o consumo são apresentados a seguir na Tabela (7).

Gráfico 3: Curva analítica obtida pela correlação da absorbância em 575 nm em função da concentração de glicose obtidos pelo métodos DNS.



Fonte: A autora

Tabela 7: Consumo de glicose (%) pelas diferentes linhagens de *Yarrowia lipolytica* em 9 dias de fermentação em função da concentração inicial de glicose no meio.

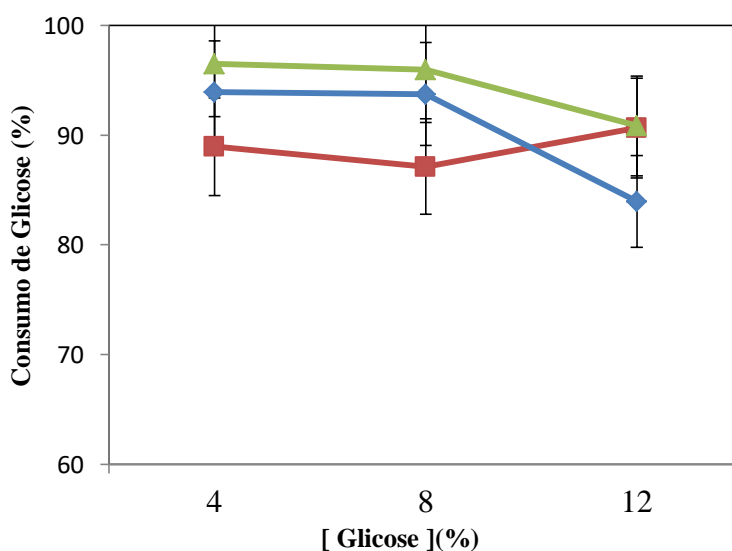
Linhagem	Consumo de glicose (%)		
	4	8	12
QU123	88,96	87,13	90,65
QU69	93,93	93,75	83,95
QU31	96,50	95,98	90,85

* Casca de mandioca *in natura* obteve-se um valor de 2,11.

Fonte: A autora

Para melhor visualização dos resultados foi plotado o Gráfico (4), do consumo de glicose por cada linhagem.

Gráfico 4 : Consumo de glicose observado utilizando as linhagens QU123, QU69, QU31, obtidos em função da concentração de glicose no meio.



Os resultados apresentados demonstram que ao utilizar a linhagem QU123 observou-se melhor adaptação ao meio com alta concentração de glicose, visto que quando se aumentou a concentração de glicose no meio a levedura por sua vez aumentou seu consumo, obtendo seu melhor desempenho na concentração de 12% de glicose consumindo 90,65% da mesma. Quando comparada sua produção de proteína, os teores foram menores se comparados a QU31, porém produziu os maiores percentuais de lipídios. Como citado anteriormente por Nicolau (2014), as leveduras sintetizam e

acumulam solutos compatíveis com o metabolismo e crescimento celular mesmo em elevadas concentrações de açúcares com a finalidade de estabelecer o equilíbrio osmótico com o meio envolvente, acumulando por exemplo, sacarose e polióis (ex. arabitol, glicerol, manitol).

O consumo de glicose pela levedura se mostrou eficiente, sendo que em sua totalidade, as linhagens consumiram valores superiores a 80% da glicose presente nas amostras, uma vez que o valor de glicose presente na casca de mandioca era descontado do valor final durante a determinação.

Para a linhagem de QU31 o consumo foi de 90,85% em 12% de glicose e 95,98% em 8% sendo este seu melhor desempenho e 95,50% para 4% de glicose mostrando um consumo eficiente da glicose.

A linhagem de QU69 variou seu consumo de 83,85% com 12% de glicose para 93,75% para 8% de glicose, da mesma forma que as demais linhagens obtiveram um bom consumo superior a 80% da glicose adicionada ao meio foi utilizada como substrato pelas linhagens. Tal fato sugere que em altas concentrações de glicose, a levedura pode sofrer alterações nas rotas metabólicas e com isso alterar seus ciclos de crescimento e reprodução, o que se verifica pela redução de produção de proteínas e lipídios conforme se aumentou-se a concentração de glicose no meio.

Em seu estudo Amaral *et al.*, (1989) utilizou como fonte de carbono a glicose (20g/L) para a síntese do biossurfactante denominado Yansan, a partir de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682. Onde o biossurfactante apresentou alta atividade de emulsificação e capacidade de estabilização de emulsões óleo/água, mostrando desta forma que a levedura trabalha bem com este substrato.

FLORES *et al.*, (2000) nos diz ainda que a maioria das leveduras “não-convencionais”, como *Y. lipolytica*, em contraste com *S. cerevisiae*, em que a respiração aeróbica é essencial para o uso de açúcares, a *Y. lipolytica* não tem sua taxa de respiração, seu conteúdo de citocromos ou propriedades mitocondriais afetados por altas concentrações de glicose, demonstrando que ela se comporta bem neste tipo de meio.

Neste caso, foi possível observar que elevar as concentrações de glicose ao extremo, não atuou de forma benéfica na melhoria nutricional da biomassa.

4.6. Avaliação dos carboidratos totais

A determinação dos carboidratos em alimentos está relacionada com suas funções nutricionais e suas propriedades reológicas. Na Tabela (8) são apresentados os valores de carboidratos totais calculados para as biomassas produzidas.

Tabela 8: Carboidratos Totais (%) para as biomassas liofilizadas obtidas em diferentes concentrações de glicose.

Linhagens	Concentrações de Glicose (%)			
	0	4	8	12
QU31	13,35	10,16	16,98	36,07
QU123	9,04	19,21	14,46	32,36
QU69	9,25	22,08	43,03	56,37

Fonte: A autora

Segundo Checchi (2003), as propriedades físico-químicas dos alimentos doçura, aparência, estabilidade, textura dependem do tipo e concentração de carboidratos presentes.

Como os carboidratos totais foram calculados pela diferença entre as demais análises não foi possível determinar o desvio padrão e o intervalo de confiança. Podemos observar que os valores de carboidratos tiveram suas maiores variações para a QU31 conforme se aumentou a concentração de glicose, iniciando em 13,35% sem adição de glicose e com 12% de glicose teve seu valor máximo de 36,07% de carboidratos totais.

Para a linhagem de QU123 ocorreu o mesmo que a linhagem anterior, tendo um aumento na % de carboidratos conforme se aumentava a concentração de glicose tendo seu valor maior em 12% de glicose chegando a 32,36%.

A linhagem de QU69 apresentou os melhores valores se comparada às demais linhagens, ocorrendo um ganho expressivo de cerca de 6 vezes o valor inicial, saindo de 9,25% sem adição de glicose para 56,37% com 12% de glicose.

5.0. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível observar de maneira geral que as diferentes linhagens de *Yarrowia lipolytica* optaram por vias metabólicas diferentes. Ao passo que com a QU123 obtivemos melhores resultados para lipídeos, com a QU31 obtivemos seus melhores resultados quanto ao teor de proteína.

Ambas as linhagens obtiveram bons resultados quanto à produção de proteína, podendo ser utilizadas em futuras pesquisas para a implementação como suplemento em alimentação de animais de criação.

Os resultados apresentados neste estudo nos permitem abrir espaço para pesquisas em várias áreas do conhecimento, como a área de ciência e tecnologia de alimentos e nutrição, pois, a valorização nutricional de resíduos utilizando microorganismos pode abrir caminho para o desenvolvimento de parcerias entre empresas e centros de pesquisas.

6.0. REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, J.J.S.; PRADO, I.N.; PEROTTO, D. et al. **Características de carcaças e da carne de tourinhos submetidos a dietas com diferentes níveis de substituição do milho por resíduo úmido da extração da fécula de mandioca.** *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.34, n.5, p.1640-1650, 2005.

AMARAL, P. F. F.; DA SILVA, J. M.; LEHOCKY, B. M., BARROS-TIMMONS A. M. V.; COELHO, M. A. Z.; MARRUCHO, I. M.; COUTINHO, J. A. P.; **Process Biochem.** 2006, 41,1894.

ANUPAMA, P.; RAVINDRA. **Value-added food: Single cell protein.** *Biotechnology Advances*, v. 18, p. 459-479, 2000.

ARPINI,F.S. **Processos fermentativos em resíduos agroindustriais utilizando a levedura *Yarrowia lipolytica*** **qu69.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, Paraná, 2017.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS– AOAC.**Official Methods of Analysis.** 15.ed. Arlington, Virginia: 1117,p.1990.

AZAMBUJA,S.P.H. **Fisiologia e capacidade de acúmulo de lipídeos de diferentes linhagens de *Yarrowia lipolytica* e *Rhodospiridium toruloides* em meio contendo glicerol,** Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2016.

BACCIOTTI, F. **Fisiologia e formação de partículas lipídicas durante o crescimento da levedura *Yarrowia lipolytica*** IMUFRJ 50682. 2015. 119f. Dissertação (Mestrado) –Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2015.

BARTH, G.; GAILLARDIN, C. **Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*.** *FEMS Microbiology Review*, v. 19, p. 219–237, 1997.

BENTO, T.F.S.R. **Composição lipídica do óleo produzido por *Yarrowia lipolytica*,** Dissertação de mestrado em Ciências, programa de pós graduação em engenharia Química na área de novos materiais, escola de engenharia de Lorena, Lorena, São Paulo,2017.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. **A rapid method of total lipid extraction and purification.** *Canadian Journal Biochemistry Physiological*, Ottawa, v. 27, n. 8, p. 911-917, 1959.

BRASILEIRO, O. L; **Avaliação funcional e nutricional do concentrado protéico e da farinha liofilizada de resíduo de camarão.** João Pessoa, 2013.

CECCHI, H. M.; **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos.**2º Ed. Ver. Campinas, SP. Editora da Unicamp,2003.

CEREDA, M. P.; VILPOUX, O; DEMIATTE, I. M.; **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas. Amidos modificados.** Sao Paulo, Fundacao Cargill.Serie: Culturas de tuberosas amilaceas Latino-americanas vol. 3 Cap.12, 2003.

CSUTAK, O. et al. **Biotechnological ApplicationsofYarrowia lipolytica CMGB32.** *Agriculture And Agricultural ScienceProcedia*, [s.l.], v. 6, p.545-553, 2015.

DOES, A. L.; BISSON, L. F. **Comparison of glucose uptake kinetics in different yeasts.***Journal of bacteriology*, v. 171, n. 3, p. 1303–8, mar. 1989.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA –EMBRAPA **MANDIOCA E FRUTICULTURA.** 2006. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/index.php?p=pesquisa-culturas_pesquisadas_mandioca.php&menu=2> Acesso em: 03 de marco de 2018.

FAO - **Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura.** *Corporate Document Repository.Crop Prospects and Food Situation* – Nº.4, 2008.

FICKERS, P. et al. **Hydrophobic substrate utilisation by the yeast Yarrowia lipolytica, and its potential applications.** FEMS yeastre search, v. 5, n. 6-7, p. 527–43, abr.2005.

FLORES, C. L.; RODRIGUEZ, C.; PETIT, T.; GANCEDO, C. **Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional.** Yeasts. FEMS Microbiology Reviews, v. 24, pp. 507-529, 2000.

FURUYA, W. M.; SERON, S.; VARGAS, L.; HAYASHI, C.; FURUYA, V. R. B.; SOARES, C. M. **Níveis de levedura desidratada “spray-dried” na dieta de alevinosrevertidos de tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus L.).** Ciência Rural, v. 30, p. 699-704, 2000.

GÉLINAS, P.; BARRETTE, J. **Protein enrichment of potato processing waste through yeast fermentation.***Bioresource Technology*, v. 98, 1138-1143, 2007.

HAGLER, A N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. **Yeasts from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the state of Rio de Janeiro, Brazil.***Applied and environmental microbiology*, v. 41, n. 1, p. 173–8, jan. 1981.

IBGE. Indicadores IBGE: **estatística da produção agrícola.** jan. 2011. 42 p. Disponível em: . Acesso em: 20 mar. 2018.

JOSHI, V. K.; SANDHU, D. K. **Preparation and evolution of animal feed by product produced by solid - state fermentation of apple pomace.** *Bioresource Technology*, v.56, n.2-3, p.251-255, 1996.

JUNIOR.F.R.S.M; **Conversão por via biotecnológica de glicerina residual em biomassa de leveduras como fonte de proteína e lipídios.**Universidade Federal do Rio Grande escola de química e alimentos programa de pós-graduação em engenharia e ciência de alimentos, Pelotas-Rs, 2010.

LEE, B.; KIM, J. K. **Production of Candida utilis biomass on molasses in different culture types.** *Aquacultural Engineering*, v. 25, p. 111-124, 2001.

LIMA, U. A.; SATO, S. **Proteínas de origem microbiana.** In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. *Biotecnologia Industrial*. v. 4. São Paulo.

LOPES .V. R. O., FARIAS.M. A. , BELO I. M. P, COELHO.M. A. Z. **Nitrogen sources on tpomw valorization through solid state fermentation performed by Yarrowia lipolytica**, *Brazilian Journal of Chemical Engineering* V. 33, N. 02, p. 261 - 270, April - June. 2016.

MENEZES,E,M,S; TORRES,A,T; SRUR,A,U,S. **Valor nutricional da polpa de açaí (Euterpe oleracea Mart) liofilizada.** vol. 38(2) 2008: 311 – 316. *ACTA AMAZONICA*. 2008.

MORETTO, E. FETT, R. GONZAG, L. KUSKOSKI, E, M. **Introdução a ciência de alimentos.** 2 Ed. da UFSC, Florianópolis, 2008.

NICOLAU,P.B. **Microrganismos e crescimento microbiano**, Universidade Aberta, 2014

OLIVEIRA.P.H.S, **Análise fisiológica e cinética do crescimento da levedura oleaginosa Yarrowia lipolytica IMUFRJ 50682 em diferentes fontes de carbono**, São Paulo, 2014.

ROSA, M. SOUZA FILHO, M S. FIGUEIREDO, M. C. B. MORAIS, J. P. S. SANTAELLA, S.T. LEITÃO, R.C. **valorização de resíduos da agroindústria. II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – II SIGERA** 15 a 17 de março de 2011 - Foz do Iguaçu, PR .2011.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos.** v. 3. Pelotas, Editora universitária, 2000.

RODRIGUEZ, G.; PAIS, C. **The Influence of Acetic and Other Weak Carboxylic Acids on Growth and Cellular Death of the Yeast Yarrowia lipolytica.** *Food Technology and Biotechnology*, v. 38, pp. 27–32, 2000.

ROEPCKE, C. B. S. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de biomassa de levedura rica em zinco orgânico.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 133 p. 2007.

SANTOS, L. D.; FURUYA, W. M.; MATSUSHITA, M.; SILVA, L. C. R.; SILVA, T. S. C.; BOTARO, D. **Ácido linoléico conjugado (CLA) em dietas para tilápia-do-nilo: desempenho produtivo, composição química e perfil de ácidos graxos.** *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, p. 1481-1488, 2007.

SILVA, A. L. F. **Compostagem de casca de mandioca e seus efeitos sobre as propriedades químicas e biológicas do solo.** 2010. 98 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Acre, 2010.

TURKI, S. et al. **A highly stable *Yarrowia lipolytica* lipase formulation for the treatment of pancreatic exocrine insufficiency.** *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 57, n. 4, p. 139–49, dez. 2010. Universitária – UFPel, 2000.

VANDENBERGHE, L.P. et al. **Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*.** *Bioresource Technology*, [s.l.], v. 74, n. 2, p. 175–178, set. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00107-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00107-8).

VILLAS-BÔAS, S. G.; ESPOSITO, E. **Bioconversão do bagaço de maçã: Enriquecimento nutricional utilizando fungos para produção de um alimento alternativo de alto valor agregado.** *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 14, n. 1, p. 38–42, 2000.

VENDRUSCOLO, F. et al. **Tratamento biológico do bagaço de maçã e adição em dieta para alevinos.** *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, p. 487–493, nov. 2008.

WALKER, G. M. **Yeast Physiology and Biotechnology.** [s.l.] John Wiley & Sons Ltd - England, 1998.

WANG, Nam Sun. **Experiment no. 4a: glucose assay by dinitrosalicylic colorimetric method.** Department of Chemical & Biomolecular Engineering University of Maryland. Disponível em: ><http://www.eng.umd.edu/~nsw/ench485/lab4a.htm>> Acesso em: 26 out. 2018.

WORKMAN, M.; HOLT, P.; THYKAER, J. **Comparing cellular performance of *Yarrowia lipolytica* during growth on glucose and glycerol in submerged cultivations.** *AMB Express*, v. 3, n. 58, p. 1–9, 2013.

ZEOULA, L.M.; CALDAS NETO, S.F.; GERON, L.J.V. **Substituição do milho pela farinha de varredura de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em rações de ovinos: consumo, digestibilidade, balanços de nitrogênio e energia e parâmetros ruminais.** *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 32, n. 2, p. 491–502, 2003.